

Teil I

Vergleich der ester- und amidspaltenden Aktivitäten
verschiedener Trypsinformen und Untersuchung
des kinetischen Verhaltens dieser Komponenten bei
Titration mit zwei Proteinaseinhibitoren

Teil II

Elektrophoretische Charakterisierung
verschiedener Fraktionen eines
Trypsin-Plasmin-Inhibitors aus den Speicheldrüsen des
Hirudo medicinalis und Isolierung der Fraktion mit der
höchsten spezifischen Aktivität

Robert Biekarck

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
der Universität München

Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. rer.nat. H. Fritz

Teil I

Vergleich der ester- und amidspaltenden Aktivitäten verschiedener Trypsinformen
und Untersuchung des kinetischen Verhaltens dieser Komponenten
bei Titration mit zwei Proteinaseinhibitoren

Teil II

Elektrophoretische Charakterisierung verschiedener Fraktionen
eines Trypsin-Plasmin-Inhibitors aus den Speicheldrüsen des *Hirudo medicinalis*
und Isolierung der Fraktion mit der höchsten spezifischen Aktivität

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Robert Biekarck
aus Augsburg

München 1976

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Fritz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Zachau

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.2.1976



Teil I

Vergleich der ester- und amidspaltenden Aktivitäten verschiedener Trypsinformen und Untersuchung des kinetischen Verhaltens dieser Komponenten bei Titration mit zwei Proteinaseinhibitoren

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AS	Aminosäure
BAEE	N ^α -Benzoyl-L-argininäthylester
BAPA	N ^α -Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid
BPTI	Basic pancreatic trypsin inhibitor
CM-	Carboxymethyl-
HUSI	Humanspermaplasma-Inhibitor
MG	Molekulargewicht
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
SAI	Seeanemonen-Inhibitor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SP-	Sulfopropyl-
TPCK	N ^α -Tosyl-L-lysyl-chlormethan
TRA	Triäthanolamin
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan

Inhaltsverzeichnis

- 1 Theoretischer Teil
 - 1.1 Bildung und Bedeutung des Trypsins
 - 1.2 Charakterisierung von α - und β -Trypsin
 - 1.3 Mechanismus der enzymatischen Wirkung
 - 1.4 Trypsininhibitor aus Seeanemonen
 - 1.5 Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor I aus Humanspermaplasma
- 2 Eigene Untersuchungen
 - 2.1 Meßmethoden
 - 2.1.1 Messung der Trypsinaktivität
 - 2.1.1.1 mit BAPA als Substrat
 - 2.1.1.2 mit BAEE als Substrat
 - 2.1.2 Messung der Inhibitoraktivität
 - 2.1.3 Bestimmung der Trypsinkonzentration durch Absorptionsmessung
 - 2.2 Darstellung von α - und β -Trypsin
 - 2.2.1 Eingesetztes Ausgangsmaterial
 - 2.2.2 TPCK-Behandlung
 - 2.2.3 Gleichgewichtschromatographie
 - 2.2.4 Entsalzung
 - 2.2.5 SDS-Acrylamidgel Elektrophorese

- 2.3 Charakterisierung des α - und β -Trypsins
 - 2.3.1 Konzentrationsbestimmung der Trypsinlösungen durch Extinktionsmessung bei 280 nm
 - 2.3.2 Verhältnis der Ester- zur Amidspaltungsgeschwindigkeit
 - 2.3.3 Vergleich der Hemmwirkung von HUSI-I auf die Trypsinderivate
 - 2.3.4 Vergleich der Hemmwirkung des SAI auf die Trypsinderivate

3 Diskussion

1 Theoretischer Teil

1.1 Bildung und Bedeutung des Trypsins

Der exkretorische Anteil des Pankreas produziert neben zahlreichen Enzymen zur Kohlenhydrat-, Fett- und Eiweißverdauung die inaktive Vorstufe des für die Proteinspaltung notwendigen Trypsins, das Trypsinogen. Dieses wird über den Ductus pancreaticus durch den Sphinkter Oddi in das Duodenum entleert und dort von der durch die Schleimhautzellen produzierten Dünndarmenterokinase oder durch Autodigestion, d.h. von bereits aktiven Trypsinmolekülen, aktiviert.

Auch die Trypsinherstellung aus Rinderpankreas im Labor hält sich z.T. an diese physiologische Aktivierung. Man läßt auf aus Pankreas extrahiertem und gereinigtem Trypsinogen (1,2,3, 4,5) - bei dem dem Dünndarmmilieu entsprechenden pH 8 - kleine Mengen Trypsin (1,6) oder Enterokinase (7,8) einwirken. Ferner bedient man sich artifizieller Methoden, wie der bei gleichem pH ablaufenden Aktivierung durch Thrombin (9) oder der Spaltung durch verschiedene Aspergillus- (10,11) und Schimmelpilzstämme (12,13). Letztere wird bei niedrigeren pH-Werten durchgeführt, die eine autokatalytische Aktivierung praktisch ausschließen.

1.2 Charakterisierung von α - und β -Trypsin

Ziel dieser Bemühungen ist die Verkürzung des Trypsinogenmoleküls um ein Hexapeptid vom Aminoende her (14). Damit erhält man die erste aktive Trypsinform, die sog. "single chain form" oder β -Trypsin (5). Die Spaltung läuft autokatalytisch weiter und führt auch zu einem Bruch zwischen Lys 131 und Ser 132 (5). Es entsteht so das sog. α -Trypsin, das aus zwei Ketten besteht, die durch sechs Disulfidbrücken zusammengehalten werden (15,16). Es können noch weitere Spaltstellen entstehen: Arg 105 Val 106 (17) und Lys 176 Asp 177 (18), die jedoch zu Trypsinformen führen, die nur noch sehr schwach aktiv sind und uns hier nicht weiter beschäftigen sollen.

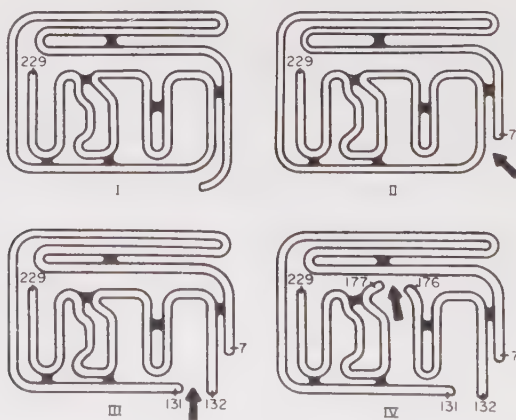


Abb.1 Schematische Darstellung von Trypsinogen (I), β - (II) und α -Trypsin (III), δ -Trypsin (IV); Aus: The Enzymes, Bd.III, Acad.Press, 1971;

Wesentlich weiter im alkalischen Bereich als ursprünglich angenommen (23) liegt der isoelektrische Punkt von Trypsin (hier, wie im Folgenden ist immer ein α -, β -Gemisch gemeint, wenn von Trypsin gesprochen wird), nämlich bei pH 10,8 (24,25).

Das aus der bekannten Primärstruktur errechnete Molekulargewicht beträgt für Trypsin 23 985 und stimmt gut mit den Ergebnissen früher durchgeführter physikalisch-chemischer Messungen überein. Die Konzentration einer Trypsinlösung kann aus ihrer Extinktion bei 280 nm errechnet werden: $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 15,4$ (26).

In Lösungen von pH 3, in der Kälte gelagert, behält Trypsin seine Aktivität über Wochen, wodurch jedoch nicht eine chemische Veränderung ausgeschlossen ist, denn selbst an lyophilisierten, bei 4°C aufbewahrten Proben wurde eine langsame Selbstverdauung beobachtet (5). Bei pH-Werten über 11 wird Trypsin reversibel denaturiert. Die für die Enzymaktivität optimale H^+ -Ionenkonzentration liegt zwischen pH 7 und 9.

Da bis vor kurzer Zeit noch keine Röntgenstrukturanalysen an Trypsinkristallen durchgeführt worden waren, war die genaue dreidimensionale Struktur noch unbekannt. Messungen der optischen Drehung wiesen darauf hin, daß das Enzym größere α -Helices vermissen läßt (27,28). Auf Grund von Homologien in der Primärstruktur von Chymotrypsin und Trypsin (22 u.a.), der relativen Position der Disulfidbrücken (29 u.a.) und topographi-

scher Überlegungen (5 u.a.) nahm man eine Ähnlichkeit der Tertiärstruktur der beiden Enzyme an. Kürzlich wurden diese Erwartungen durch Röntgenstrukturanalyse von Rindertrypsin bestätigt (64). Die völlig unabhängig von Chymotrypsin erhaltenen Ergebnisse zeigen eine sehr große Übereinstimmung zwischen den beiden Pankreasenzymen nicht nur bezüglich der räumlichen Struktur des Gesamtmoleküls, sondern auch in der Konformation der Peptide.

1.3 Mechanismus der enzymatischen Wirkung

Trypsin katalysiert folgende Reaktion:



Der umseitig dargestellte Reaktionsablauf gilt im wesentlichen auch für Trypsin. Es handelt sich um einen drei-Stufen-Mechanismus, an dem ein Serin- und ein Histidinrest maßgeblich beteiligt sind, letzterer als Protonendonator und -akzeptor. Die Reaktion erfolgt mit den Carboxylgruppen der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin. Der Serinrest des Enzyms (E) wird in einer nukleophilen Reaktion (n.R.) hauptvalenzmäßig an die entsprechende Carboxylgruppe des Substrates (S) angelagert. Bei dieser reversiblen Reaktion dient der Histidinrest als Protonenakzeptor. Aus diesem instabilen Enzym-Substrat-Komplex (ES) spaltet sich H_2N-X als 1.Produkt (P_1) ab, wobei der

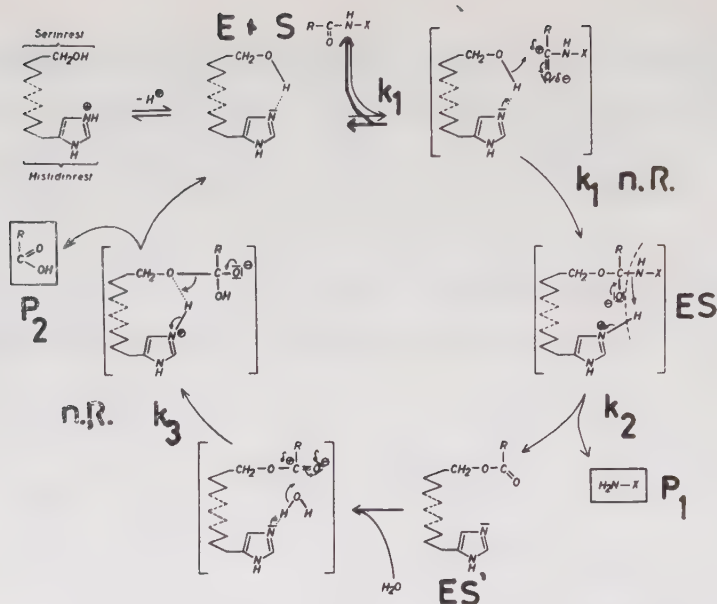


Abb.3 Wahrscheinlicher Mechanismus einer zweistufigen hydrolytischen Peptidspaltung am Beispiel des Chymotrypsins. Aus P. Karlson, Biochemie, G. Thieme Verlag, Stuttgart 1967; n.R.= nukleophile Reaktion

Histidinrest jetzt als Protonendonator mitwirkt. Nun wird die Hydrolyse durch Wasseranlagerung an die Enzym-O-Acylverbindung eingeleitet und in einer erneuten nukleophilen Reaktion, bei der Histidin wiederum als Protonenakzeptor und -donator dient, durch Spaltung der Esterbindung beendet. Damit erscheint das 2. Produkt (P_2) und das Enzym ist wieder in seiner ursprünglichen Form vorhanden.

1.4 Seeanemoneninhibitor (SAI)

Béress et al. fanden in Seeanemonen einen Inhibitor (55,56), der die gleiche Hemmspezifität aufweist wie der nur in Bovinae und Caprinae vorkommende Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (BPTI) (56,57). Die biologische Funktion des SAI ist noch unbekannt. Interessanterweise befindet sich die höchste Inhibitorkonzentration in den Tentakeln (58).

Zur Reindarstellung des SAI (59,60) werden alkoholische Extrakte der homogenisierten *Anemonia sulcata* dialysiert. Die stark basischen Inhibitoren werden von den weniger basischen Toxinen durch Adsorption an CM-Cellulose im Satzbetrieb getrennt. Nach Desorption mit 1 M NaCl und Gelfiltration an Sephadex G-50 wird das Inhibitorgemisch durch Chromatographie an SP-Sephadex C-25 mit Hilfe eines linearen NaCl-Gradienten in verschiedene Isoinhibitoren aufgetrennt. Nach Entsalzung werden die Isoinhibitoren rechromatographiert (59).

Isoinhibitor 5-II (59), der mengenmäßig den größten Anteil darstellt, ist homogen bei Gelfiltration, Ionenaustauschchromatographie, Acrylamidgel- und SDS-Acrylamidgel-Elektrophorese. Er wurde für die folgenden Untersuchungen (in 2.3.4) verwandt. Durch Edman-Abbau wurde Isoleucin als N-Terminus bestimmt, gefolgt von Asparaginsäure und Glycin. Die Aminosäurenzusammensetzung ist bekannt (59), die Sequenz wird zur Zeit erforscht

(63). Isoinhibitor 5-II besteht aus 60 Aminosäuren und besitzt drei Disulfidbrücken, von denen sich eine als sehr stabil gegen Reduktion erwies. Das reaktive Zentrum enthält Arginin (57). Interessant ist ferner die strukturelle Homologie zum BPTI (63).

Die Affinität der SAI-Inhibitoren und des BPTI zu Trypsin, Plasmin und Chymotrypsin ist vergleichbar. Die Affinität zu Schweinepankreas-Kallikrein steigt mit der Basizität der Isoinhibitoren.

Weiterhin unterscheidet sich SAI 5-II von BPTI dadurch, daß er nach i.v. Injektion nicht in den Nieren gespeichert, sondern im Urin ausgeschieden wird (61). Die Überlebenschancen verbrühter Ratten werden durch i.v. Injektion noch mehr erhöht als durch BPTI (62).

1.5 Humanspermaplasma-Inhibitor I (HUSI-I)

Im Seminalplasma und in den Spermatozoen (45,46) des Menschen findet man zwei Proteinaseinhibitoren, HUSI-I und HUSI-II. Die Produktion der beiden Inhibitoren wird möglicherweise durch Androgene geregelt (41,43). HUSI-II, ein potenter Akrosininhibitor (51), ist von HUSI-I in einem in l.c. (49) beschriebenen

Verfahren zu trennen.

Das Molekulargewicht von HUSI-I liegt bei 12 000. Er ist ein Trypsin- und Chymotrypsininhibitor, der nach seiner Trennung von HUSI-II durch Ionenaustauschchromatographie mit Hilfe eines linearen Salzgradienten in mehrere Fraktionen aufgetrennt werden kann. Unterwirft man Fraktion D danach einer Gleichgewichtschromatographie und beseitigt dadurch noch anhaftendes, inaktives Protein, so zeigt die auf Acetatfolie bei pH 8,5 durchgeführte Elektrophorese eine einzige Bande (49). Durch Edman-Abbau wurde Tyrosin als einziger N-terminaler Rest bestimmt, gefolgt von Leucin (50).

HUSI-I ist der erste bekannte, natürlich vorkommende Trypsininhibitor ohne die Trypsin-spezifischen Aminosäurereste Lysin und Arginin im reaktiven Zentrum (44). Möglicherweise ist die biologische Aktivität von HUSI-I gegen eine Proteinase mit Trypsin-ähnlicher Tertiärstruktur im reaktiven Zentrum, aber mit unterschiedlicher Substratspezifität gerichtet (51).

HUSI-I hemmt Eber- und Humanekrosin nicht, jedoch die Caseinhydrolyse neutraler Leukozytenproteinasen (49). Somit ist anzunehmen, daß HUSI-I in eine besondere Gruppe von Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitoren gehört, gemeinsam mit den Inhibitoren aus den Respirationsdrüsen (47) und aus dem Cervicalsekret (48), die alle stabile Komplexe mit neutralen Leukozytenproteinase

bilden. In der Hemmung dieser Proteinase ist wahrscheinlich auch die ~~bi~~ologische Funktion des HUSI-I zu suchen: In Gebieten hoher Spermiedichte, wie Samenplasma und Cervicalmucus nach der Kohabitation, befinden sich große Mengen an Leukozyten. HUSI-I wird hier die Aufgabe zufallen, die Spermatozoen und die Basalmembranen des Genitaltraktes vor dem hydrolytischen Effekt der neutralen Leukozytenproteinase zu schützen (51).

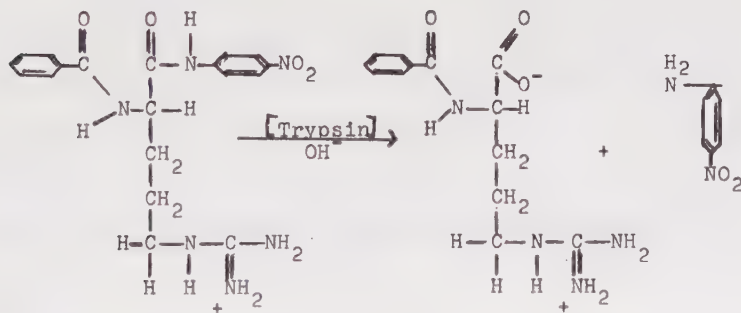
2 Eigene Untersuchungen

2.1 Messmethoden

2.1.1 Messung der Trypsinaktivität

2.1.1.1 mit BAPA als Substrat

Prinzip: Trypsin spaltet das synthetische Amidpräparat DL- bzw. L-BAPA (nur das L-Isomer wird gespalten, das D-Isomer ist ein kompetitiver Hemmer). Dabei wird das gelbe p-Nitroanilin freigesetzt; die Zunahme der Gelbfärbung/min wird über 5 Minuten bei 405 nm gemessen und ist der Trypsinaktivität direkt proportional.



N^α-Benzoyl-DL-arginin-p-Nitroanilid
(farblos)

N^α-Benzoylarginin + p-Nitroanilin
(gelb)

Geräte: Photometer mit Filter für 405 nm und thermostatisierbarem Küvettenhalter;

Reagentien:

- a) Trypsin-Standardlösung: Je 1 mg α -, β -Trypsin und Trypsin der Fa. Novo in 10 ml einer 0,0025 N HCl-Lösung + 0,02 M CaCl_2 ; Aufbewahrung bei 0 - 4°C;
- b) Puffer: 0,067 M Triäthanolamin (TRA), pH 8,0;
- c) Substrat: L-BAPA (50 mg/100 ml aqua dest., gelöst im Wasserbad bei 80°C);

Küvettenansätze:

- a) Leerwert: 0,1 ml der 0,0025 N HCl-Lösung + 0,02 M CaCl_2 + 1,9 ml TRA;
- b) Trypsinwert: 0,02 - 0,1 ml der Trypsin-Standardlösung mit TRA-Puffer auf 2 ml auffüllen;

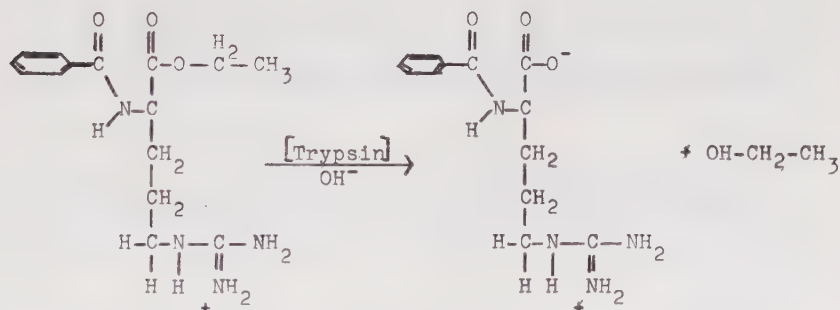
Beide Ansätze werden bei 25°C in den Küvetten gemischt. Dann wird jeweils 1 ml der L-BAPA-Lösung zugegeben und gemischt. Die Extinktionsänderung wird pro Minute ($\Delta E/\text{min}$) 5 Minuten lang bei 405 nm gemessen.

Berechnung:

Der Mittelwert ΔE_M aus den vier $\Delta E/\text{min}$ -Werten wird durch den einer Enzym-Millieinheit entsprechenden Betrag (1 mU = 0,00332 $\Delta E/\text{min}$) dividiert (32):
$$\frac{\Delta E_M}{0,00332} = \text{mU}$$

2.1.1.2 mit BAEE als Substrat

Prinzip: Trypsin spaltet das synthetische Esterpräparat BAEE. Die direkte Verfolgung der Esterspaltung bei 253 nm ist möglich mit einem Spektralphotometer genügender Empfindlichkeit (Zeiss PMQ-III). Die Zunahme der $\Delta E/\text{min}$ wird über 10 min gemessen und ist der Enzymaktivität direkt proportional.



N^B-Benzoyl-L-arginin-Äthylester

N^B-Benzoylarginin + Äthanol

Geräte:

Zeiss PMQ-III, Mikropipetten Eppendorf, Quarzglasküvetten;

Reagentien:

Wie 2.1.1.1, jedoch statt L-BAPA wird BAEE als Substrat verwendet. Trypsinstandardlösung 1:10 verdünnt.

Küvettenansätze:

- a) Leerwert: 0,1 ml der 0,0025 N HCl-Lösung + 0,02 M CaCl_2 + 2,4 ml TRA-Puffer, mischen;
- b) Trypsinwert: 0,02 - 0,1 ml der 1:10 verdünnten Trypsin-Standardlösung. Mit TRA-Puffer auf 2,5 ml auffüllen, mischen;

Beiden Ansätzen wird je 0,5 ml BAEE-Lösung (1mg/ml aqua dest.) zugesetzt und gemischt. Die Extinktionsänderungen $\Delta E/\text{min}$ werden über 10 Minuten verfolgt. Küvettentemperatur: 25°C.

Berechnung:

Der Mittelwert ΔE_M aus den 10 $\Delta E/\text{min}$ -Werten wird durch den einer Enzym-Millieinheit entsprechenden Betrag (1 mU = 0,00385 $\Delta E/\text{min}$) dividiert.

2.1.2 Messung der Inhibitoraktivität

Prinzip: Die Minderung der Extinktionsänderung pro Minute beim Trypsin-Inhibitor-Ansatz gegenüber der Extinktionsänderung pro Minute der inhibitorfreien Trypsinlösung ist der Inhibitoraktivität direkt proportional. Die Extinktionsänderung wird wie in 2.1.1.2 bestimmt.

Reagentien:

Wie in 2.1.1.2, zusätzlich 100 μ SAI/ml bzw. HUSI-I in einer Kon-

zentration von 160 μ /ml, das entspricht einer Extinktion von $E = 0,043$ bei 280 nm.

Geräte:

Wie in 2.1.1.2;

Küvettenansätze:

- a) Leerwert: 0,1 ml der HCl-Lösung + 0,02 M CaCl_2 + 2,4 ml TRA-Puffer;
- b) Bezugswert: 0,1 ml α -, β -Trypsin und Trypsin der Fa. Novo + 2,4 ml TRA-Puffer;
- c) Hemmwert: 0,1 ml α -, β -Trypsin und Trypsin der Fa. Novo + 10 bis 190 μ l SAI- bzw. HUSI-I-Lösung. Mit TRA-Puffer auf 2,5 ml auffüllen;

Die drei Ansätze werden gut gemischt und 10 Minuten inkubiert (25°C). Anschließend werden je 0,5 ml BAEE-Lösung zugegeben. Mischen; Messung bei 253 nm über 10 Minuten;

Berechnung:

Der Mittelwert des Bezugs- (ΔE_{MB}) und des Hemmwertes (ΔE_{MI}) wird gebildet. ΔE_{MI} wird von ΔE_{MB} subtrahiert. Man erhält so den Betrag der durch den Inhibitorzusatz verhinderten Ester-spaltung in Extinktionseinheiten. Dieser muß nun noch entsprechend den Angaben in 2.1.1.2 dividiert werden, um Inhibitor-

Millieinheiten zu erhalten:
$$\frac{\Delta E_{MB} - \Delta E_{MI}}{0,000385} = \text{mIU}$$

Bei einer Hemmung von über 70% der vorgelegten Enzymaktivität muß die Messung mit einer größeren Inhibitorverdünnung wiederholt werden, da die Hemmung bei höherem Hemmgrad der Inhibitor-konzentration meist nicht mehr proportional ist.

2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Trypsin durch Absorptions-messung

2.1.3.1 Messung mit dem Uvicord:

Die aus der Säule eluierte Lösung fließt durch den Uvicord, der eine Quecksilberlampe und ein lichtempfindliches System enthält, das kontinuierlich bei 256 nm das durch die Absorption des Eluates geschwächte Licht mißt und über einen Schreiber die entsprechende Transmission auf einem mit bestimmter Geschwindigkeit laufenden Papierband aufzeichnet.

2.1.3.2 Messung mit dem Zeiss PMQ-III

Proben der Fraktionen des Säulen-Eluates werden bei 280 nm gegen eine nur Elutionspuffer enthaltende Küvette gemessen und die Differenzwerte in eine Kurve eingetragen.

Durch beide Verfahren können die Fraktionen erkannt werden, die hohe Proteinkonzentrationen enthalten.

2.2 Darstellung von α - und β -Trypsin

2.2.1 Eingesetztes Trypsin

- 1) Trypsin vom Rind, krist. lyophil. 2,0 U/mg (E. Merck, Darmstadt); spezifische Aktivität bei unter 2.1.1.1 angegebenen Messbedingungen: 0,73 mU/ μ .
- 2) Trypsin vom Rind, krist., steril., stab., 3900 NF/mg (Novo Industri A/S); spezifische Aktivität bei unter 2.1.1.1 angegebenen Messbedingungen: 1,62 mU/ μ .

2.2.2 TPCK-Behandlung

Um das eingesetzte Trypsin von noch anhaftenden chymotryptischen Restaktivitäten (52) zu befreien, wurde es folgender Prozedur unterzogen, die eine Abwandlung der in l.c. (53) beschriebenen Vorschrift darstellt: 375 mg Trypsin wurden in 50 ml 0,1 M TRIS-Puffer + 0,02 M CaCl_2 , pH 7,1 gelöst und unter Rühren mit 0,1 Mol TPCK in 0,5 ml absolutem Methanol versetzt. Die Lösung blieb 1 Stunde und 45 Minuten bei Zimmertemperatur stehen. Der Überstand wurde abdekantiert und mit 9 mg Benzamidin-HCl versetzt. Die Lösung wurde bei 3000 Upm 10 Minuten lang zentrifugiert und der Überstand von 44 ml auf die unten beschriebene Sküle aufgetragen.

2.2.3 Gleichgewichtschromatographie

Während sich frühere Arbeiten (33,34,35) vor allem um die Entfernung inerten Proteins aus den zur Verfügung stehenden Trypsinproben bemühten, gelang Schroeder und Shaw (5) die Auftrennung in α - und β -Trypsin. Diese Methode wurde von Laskowski Jr. (36) vereinfacht und ist in folgendem, so wie sie von uns angewandt wurde, beschrieben:

SP-Sephadex C-50 wurde in aqua dest. eingeührt. Nach dem Absetzen wurde der Überstand abgegossen. Diese Prozedur wurde mehrmals wiederholt um feines Material, das die Fritte verstopfen würde, zu entfernen. Nach der letzten Dekantation wurde das Wasser durch eine Fritte gesaugt und das Gel in Puffer suspendiert. Dieser bestand aus TRIS-HCl in einer Konzentration von 0,1 Mol/l, pH 7,1. Zur Verhinderung einer tryptischen Autodigestion waren

- a) 0,02 M CaCl_2 zugesetzt, das wahrscheinlich durch Komplexbildung mit Trypsin weitere inaktivierende Spaltungen des Enzymmoleküls verhindert, ohne die Aktivität gegen Substrate herabzusetzen (24,37,38,39) und
- b) Benzamidin-HCl, dessen Konzentration mit 1 mMol/l genügend hoch über seinem K_1 -Wert für Trypsin von $1,85 \times 10^{-5}$ M liegt, um eine weitgehende Hemmung zu bewirken. Benzamidin ist nach Bier und Nord (24) neben p-Aminobenzamidin-HCl ein potenter kompetitiver Inhibitor für Trypsin.

Der Puffer über dem Ionenaustauscher wurde mehrmals erneuert und die Suspension zur weiteren Äquilibrierung über Nacht bei 4°C stengelassen. Dann wurde mit dem Gel eine Säule von 90 x 1,1 cm gepackt und zur Überprüfung der vollständigen Äquilibrierung pH und Leitfähigkeit des Eluates mit den entsprechenden Werten des Puffers im Reservoir verglichen. Die verschiedenen Chromatographien wurden z.T. bei Zimmertemperatur und z.T. bei 4°C durchgeführt, auf die Auftrennung in α - und β -Trypsin hatten diese unterschiedlichen Temperaturbedingungen keinen wesentlichen Einfluß.

Das TPCK-behandelte Trypsin wurde nun auf die Säule aufgetragen. Nach Einsickern der Trypsinlösung wurde noch 3 - 4 Mal mit je ca. 2 ml Puffer nachgewaschen und dann ein ca. 10 ml großes Pufferreservoir über der Geloberfläche angefüllt, das ständig durch einen mittels einer Pumpe dosierten Puffer ergänzt wurde. Durch die Pumpe wurde in dem bis zum Auslauf geschlossenen System ein konstanter Druck erzeugt, der einen gleichmäßigen Durchfluß von 22 ml/h bei 4°C ermöglichte. Bei der Säule, die bei Zimmertemperatur lief, ergab sich eine Durchflußgeschwindigkeit von 42 ml/h.

Die Lichtabsorption des Eluates wurde wie in 2.1.3.1 beschrieben registriert. Mit Hilfe eines Fraktomaten wurde die eluierte Flüssigkeit in 10 ml-Einheiten aufgeteilt.

Es ergaben sich folgende Elutionsdiagramme:

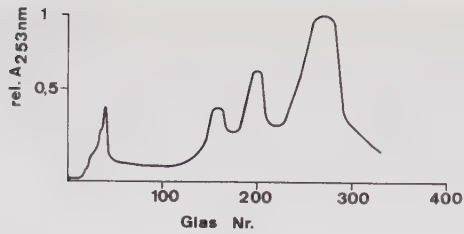


Abb. 4 Gleichgewichtschromatographie von Trypsin bei Zimmertemperatur
Puffer: 0,1 M TRIS-HCl, pH 7,1, 0,02 M CaCl₂, 1 mM Benzamidin

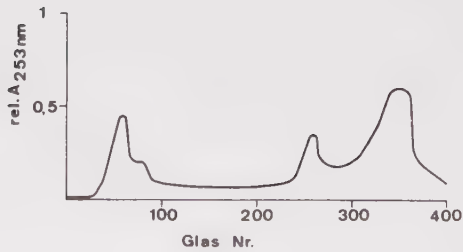


Abb. 5 Gleichgewichtschromatographie von Trypsin bei 0 - 4°C
Puffer: s. Abb. 4

Die erste Fraktion besteht aus inertem Protein, Verunreinigungen und inaktiven Trypsinbruchstücken. Die zweitletzte Fraktion ist nach Schroeder und Shaw (5) α -, die letzte β -Trypsin. Der zweite Peak in Abb. 4 entspricht dem von Schroeder und Shaw (5) als δ -Trypsin bezeichneten Produkt; es handelt sich dabei aber um ein oder mehrere noch aktive Trypsinderivate, die wie in Abschnitt 1.2 angegeben weitere Spaltungen in der Aminosäurekette aufweisen.

2.2.4 Entsalzung

Die beiden letzten Fraktionen der unter Kühlung durchgeführten Chromatographie wurden nach Laskowski, Jr. et al. (36) weiterbehandelt: Mit einer Amicon-Diaflo-Ultrafiltrationszelle (Membran: UM-05) wurden sie auf wenige Milliliter eingeeengt, nachdem das pH zuvor auf 3,0 gesenkt worden war. Die Zelle wurde dann mehrmals mit 10^{-3} N HCl/CaCl₂-Lösung aufgefüllt und jeweils wieder ultrafiltriert. Die Gesamtmenge der zur Entsalzung eingesetzten HCl/CaCl₂-Lösung war etwa 10 Mal so groß wie das Ausgangsvolumen der Trypsinlösungen. Im Anschluß daran wurden die Substanzen lyophilisiert.

Die entsprechenden Fraktionen der bei Zimmertemperatur durchgeführten Säulenzüßläufe wurden ebenfalls auf pH 3,0 eingestellt und in der Ultrafiltrationszelle eingeeengt. Die Entsalzung erfolgte jedoch an einer Sephadex G-50-Säule (45 x 2,4 cm) mit 10^{-3} N

HCl + 0,02 M CaCl_2 als Elutionsmittel. Die Trypsin enthaltenden Fraktionen wurden lyophilisiert.

2.2.5 SDS-Elektrophorese nach Weber, Pringle und Osborn (40)

Natriumdodecylsulfat zerlegt durch Reduktion der Disulfidbrücken mehrkettige Proteine in ihre Polypeptidketten. Gleichzeitig werden von den freigelegten Polypeptidketten eine große Zahl - etwa halb soviel wie Aminosäurereste vorliegen - SDS-Molekel gebunden. Dadurch werden die Peptide in zweifacher Hinsicht modifiziert: 1) Die individuelle Ladung der Ketten wird durch die einheitlich negative Ladung der SDS-Moleküle überdeckt, so daß Peptide unterschiedlichen Aufbaus eine annähernd gleiche Ladung pro Masseneinheit besitzen. Bei allen bisher untersuchten Proteinen wurden 1,4 Gramm SDS pro Gramm Protein gebunden. Die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit der Peptide durch das Polyacrylamidgel wird daher nur von ihrer Form und der Gelporosität bestimmt. Durch die SDS-Behandlung wird 2) auch die Konfiguration der Ketten verändert. Sie nehmen eine stabähnliche Form an, so daß sich ihre Wanderungsgeschwindigkeit bei gleicher Geldurchlässigkeit und gleichen Versuchsbedingungen nur auf Grund der Größe der stabartigen Partikel unterscheidet, die wiederum einzig vom Molekulargewicht des jeweiligen Peptids abhängig ist. Dank dieser beiden Gegebenheiten lassen sich die verschiedenen Proteine und Proteinketten ent-

sprechend ihrem Molekulargewicht trennen. Die Wanderungstrecke ist unter gleichen Bedingungen dem Logarithmus des Molekulargewichts direkt proportional.

Nicht zutreffend ist diese Beziehung: 1) Wenn auf Grund ungenügender Reduktion der S-S-Brücken SDS-Moleküle von versteckten Proteinanteilen nicht gebunden werden können, 2) bei besonders stark geladenen Proteinen, z.B. Histonen oder Proteinen mit hohem Lysin- und Arginin-Anteil, 3) nach künstlicher Einführung chemischer Gruppen. Peptidketten unter einem Molekulargewicht von 15 000 zeigen ebenfalls atypisches Wanderungsverhalten, da sie dazu neigen, wegen des geringen Unterschieds zwischen Längs- und Querdurchmesser kugelförmige Gestalt anzunehmen. Bei diesen kleinen Substanzen haben außerdem die 3 obengenannten Kriterien für Abweichungen durchschlagendere Wirkung und ausgeprägtere Ladungsunterschiede der nativen Protein- oder Peptidketten können trotz SDS-Behandlung noch groß genug sein, um Partikel gleichen Molekulargewichts aufzutrennen.

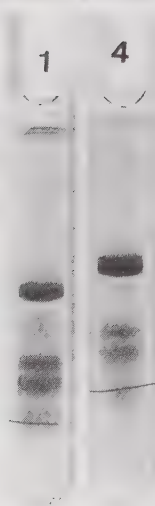
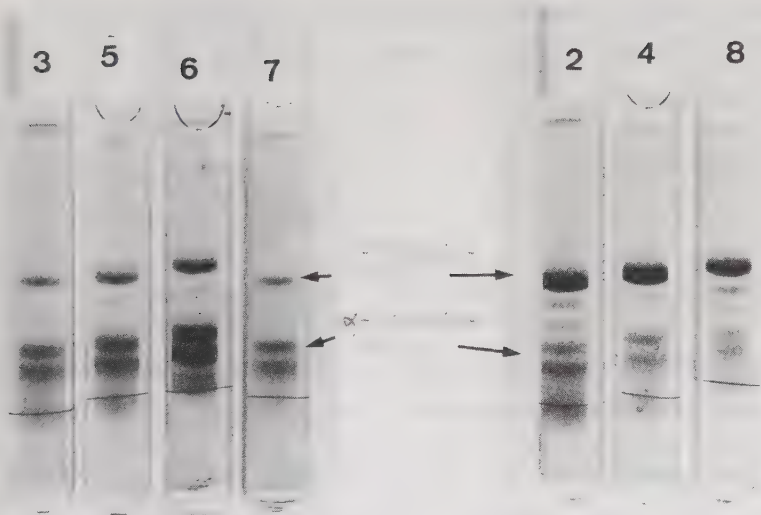
Die vier nach Abschnitt 2.2.4 entsalzten und lyophilisierten Substanzen wurden nach den von Weber, Pringle und Osborn in (40) unter Abschnitt 1 und 4a beschriebenen Methoden behandelt und an Polyacrylamidgels aufgetrennt. Angewandt wurde ein 10%iges Gel (40); die Substanzen liefen bei einer Stromstärke von 35 mA über 3 1/2 Stunden.

Eingesetzte Substanzen:

Glasnummer	Substanz	Konzentration in μ /ml
1	Novo Trypsin	500/1
2	β -Trypsin aus der gekühlten Säule	330/0,5
3	α -Trypsin aus der gekühlten Säule	320/0,5
4	wie 2, nur mit PMSF (Methode s. Abschnitt 4a) behandelt	630/1
5	wie 3, nur mit PMSF (Methode s. Abschnitt 4a) behandelt	480/0,5
6	α -Trypsin aus der nicht gekühlten Säule	370/0,5
7	α -Trypsin, Randfraktion aus der nicht gekühlten Säule	700/1,25
8	β -Trypsin aus der nicht gekühlten Säule	810/1,5

Von diesen Substanzen wurden nach 5-minütiger Inkubation mit SDS und Mercaptoäthanol bei 100°C je 0,5 ml auf die Gele aufgetragen. Die Wanderungsrichtung ist von oben nach unten. Die β -Trypsinketten legt auf Grund ihres größeren Molekulargewichtes die kürzere Strecke zurück als die beiden kleineren α -Trypsinketten.

Mit den hier beschriebenen Methoden konnte keine vollständige Auftrennung der Ausgangssubstanzen in α - und β -Trypsin erreicht werden, wohl aber eine starke Anreicherung. Gel Nr.4 zeigt deutlich den Vorteil der Behandlung mit PMSF, da hierdurch die Autolyse des Trypsins während der SDS-Behandlung verhindert wird, die die 2. und 3. Bande in den Gelen Nr.2 und 3 bewirkt.



Die Rechromatographie unter den in Abschnitt 2.2.3 beschriebenen Bedingungen (bei Zimmertemperatur) verbesserte die Auftrennung nur minimal.

2.3 Kinetische Messungen

2.3.1 Konzentrationsbestimmung der Trypsinlösungen durch Absorptionsmessung bei 280 nm

Um bei der Auswertung der folgenden Messungen von identischen Trypsinkonzentrationen ausgehen zu können, wurde die Absorption von Lösungen der drei Testsubstanzen α -, β - und Novo-Trypsin (der Einfachheit halber wird statt von angereichertem α - und β -Trypsin von α - bzw. β -Trypsin gesprochen) bei 280 nm bestimmt. Die Meßwerte wurden durch entsprechende Faktoren korrigiert, wobei die Extinktion der Novo-Trypsinlösung gleich 1 gesetzt wurde.

2.3.2 Verhältnis der Ester- zur Amidspaltung

2.3.2.1 Aktivität gegen L-BAPA in mU unter den in Abschnitt 2.1.1.1 gegebenen Bedingungen

Die Werte sind auf Lösungen identischer Extinktion umgerechnet, wie in Abschnitt 2.3.1 angegeben.

Trypsin- menge	α -Trypsin	β -Trypsin	Novo Trypsin
20 ul	1,125	1,205	1,325
50 ul	3,35	3,375	3,5
70 ul	4,82	4,55	5,12
100 ul	7,15	7,4	7,82

2.3.2.2 Aktivität gegen BAEE in mU unter den in Abschnitt 2.1.1.2 gegebenen Bedingungen

Die Werte sind auf Lösungen identischer Extinktion umgerechnet, wie in Abschnitt 2.3.1 angegeben.

Trypsin- menge	α -Trypsin	β -Trypsin	Novo Trypsin
20 ul	3,45	4,41	6,5
50 ul	9,3	11,47	12,48
70 ul	12,43	15,6	17,12
100 ul	20,08	23,8	22,18

2.3.2.3 Mittelwerte aus den Verhältnissen der BAEE-Spaltung/L-BAPA-Spaltung:

α -Trypsin	β -Trypsin	Novo Trypsin
23,7	34,4	32,47

Bezogen auf α -Trypsin: 1 : 1,2 : 1,122

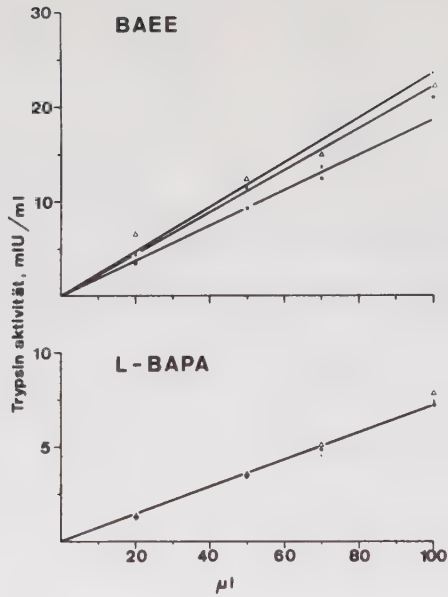


Abb.6 Gegenüberstellung von α -, β -Trypsin und eines Trypsingemisches bezüglich ihrer ester- (BAEE) bzw. amidspaltenden (L-BAPA) Aktivitäten

- : α -Trypsin
- x: β -Trypsin
- Δ: Trypsingemisch

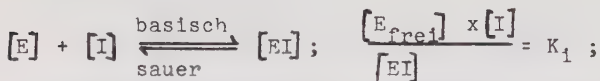
Abszisse: μ l Trypsinlösung

2.3.3 Vergleich der durch HUSI-I bewirkten Hemmung des α -, β - und Novo Trypsins

Die Novo Trypsinlösung, die für die Berechnung der Meßergebnisse als Bezugswert genommen wurde (siehe Abschnitt 2.3.1), verursachte bei 280 nm eine Absorption von $E = 0,118$. Nach Worthington (26) (siehe Abschnitt 1.2) kann die Konzentration einer Trypsinlösung aus ihrer Extinktion bei 280 nm berechnet werden, wobei gilt: $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 15,4$. Bei $E = 0,118$ liegt somit eine Konzentration von 0,0077% vor. Beim BAEE-Test, der für die Titrationsen verwendet wurde, wurde eine 1:10 Verdünnung eingesetzt, deren Trypsinkonzentration 0,00077% betrug. Da Trypsin ein Molekulargewicht von 24 000 (siehe Abschnitt 1.2) aufweist, entspricht einer 1%igen Lösung eine molare Konzentration von $0,416 \times 10^{-3}$ M. Die molare Konzentration einer 0,00077%igen Lösung beträgt somit $3,2 \times 10^{-7}$ M. In der Küvette auf 3 ml verdünnt beträgt die Konzentration $1,1 \times 10^{-8}$ M = E_{gesamt} .

Die Hemmwirkung eines Inhibitors auf verschiedene Enzymformen läßt sich am besten untersuchen, indem man die Dissoziationskonstanten der einzelnen Enzym-Inhibitor-Komplexe miteinander vergleicht. Extrapoliert man die Hemmkurven bis zur vollständigen Hemmung linear, so erhält man die Inhibitorkonzentration, bei der im Falle einer 100%igen Komplexbildung kein freies Enzym mehr vorhanden wäre. In Wirklichkeit liegt im Bereich hoher

Hemmung, da die Komplexbildung hier nicht quantitativ erfolgt, noch freies Enzym = E_{frei} vor, aus dessen Anteil sich die Dissoziationskonstante = K_1 berechnen läßt. Ihre Berechnung ergibt sich wie folgt (54):

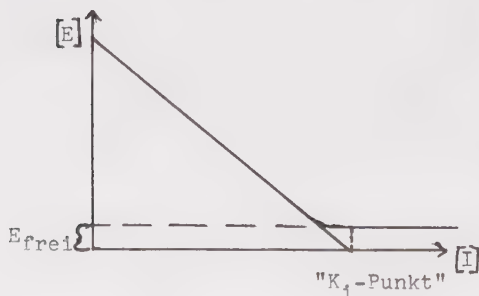


da im Gleichgewichtszustand die Konzentration von E_{frei} und I_{frei} gleich ist, ergibt sich weiterhin:

$$\frac{[E_{\text{frei}}]^2}{[EI]} = K_1$$

Die Konzentration des Komplexes kann aus der Differenz zwischen $[E_{\text{gesamt}}]$ und $[E_{\text{frei}}]$ berechnet werden:

$$\frac{[E_{\text{frei}}]^2}{[E_{\text{gesamt}}] - [E_{\text{frei}}]} = K_1$$



E_{gesamt} wurde bereits zu $1,1 \times 10^{-8}$ M berechnet. E_{frei} läßt sich aus der Restaktivität, die am - aus der Kurve bestimmten - Äquivalenzpunkt (" K_1 -Punkt") noch vorhanden ist, errechnen.

Diese Restaktivitäten E_{frei} betrugen bei Titration mit HUSI-I

für α -Trypsin 4,85 mU

für β -Trypsin 6,55 mU

für Novo Trypsin 8,05 mU

Aus dem Verhältnis der Restaktivität zur jeweiligen Gesamtaktivität erfährt man, der wievielte Teil von E_{gesamt} noch ungebunden ist. Durch Division erhält man so die E_{frei} -Werte:

α -Trypsin $0,33 \times 10^{-8}$ M

β -Trypsin $0,38 \times 10^{-8}$ M

Novo Trypsin $0,35 \times 10^{-8}$ M

Daraus ergibt sich nun nach der oben beschriebenen Formel:

$$\frac{[E_{\text{frei}}]^2}{[E_{\text{gesamt}}] - [E_{\text{frei}}]} = K_1$$

K_1 -Werte für die Komplexe mit HUSI-I

α -Trypsin $0,15 \times 10^{-8}$ M die K_1 -Werte stehen in einem Verhältnis zueinander von

β -Trypsin $0,19 \times 10^{-8}$ M 1 (α) : 1,21 (β) : 1,1 (Novo)

Novo Trypsin $0,16 \times 10^{-8}$ M

Die Hemmkurven wurden entsprechend der in Abschnitt 2.1.2 beschriebenen Methode aufgenommen.

2.3.4 Vergleich der durch den Seeanemonen-Inhibitor bewirkten Hemmung der drei Trypsinformen

Es wurde ebenfalls der in Abschnitt 2.3.3 beschriebene Weg beschritten. Für E_{frei} ergaben sich folgende Werte:

α -Trypsin $0,13 \times 10^{-8} \text{ M}$

β -Trypsin $0,16 \times 10^{-8} \text{ M}$

Novo Trypsin $0,23 \times 10^{-8} \text{ M}$

Da die Konzentrationen der eingesetzten Trypsinlösungen nicht verändert wurden, galt für E_{gesamt} wiederum $1,1 \times 10^{-8} \text{ M}$.

Als K_1 -Werte für die Komplexe mit SAI ergaben sich:

α -Trypsin $1,65 \times 10^{-10} \text{ M}$

β -Trypsin $2,55 \times 10^{-10} \text{ M}$

Novo Trypsin $5,86 \times 10^{-10} \text{ M}$

die K_1 -Werte stehen in einem Verhältnis zueinander von
1 (α) : 1,55 (β) : 3,5
(Novo)

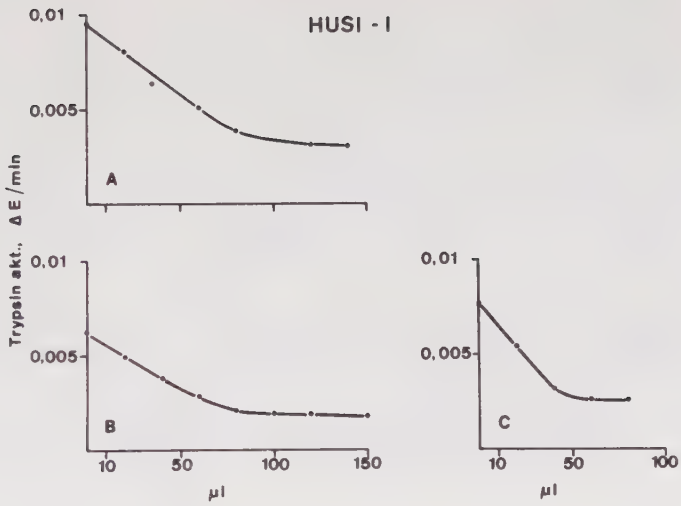


Abb.7 Titration von Trypsin mit 10 - 150 μl
HUSI-I (160 μg /ml)
A = Novo Trypsin, B = α -, C = β -Trypsin

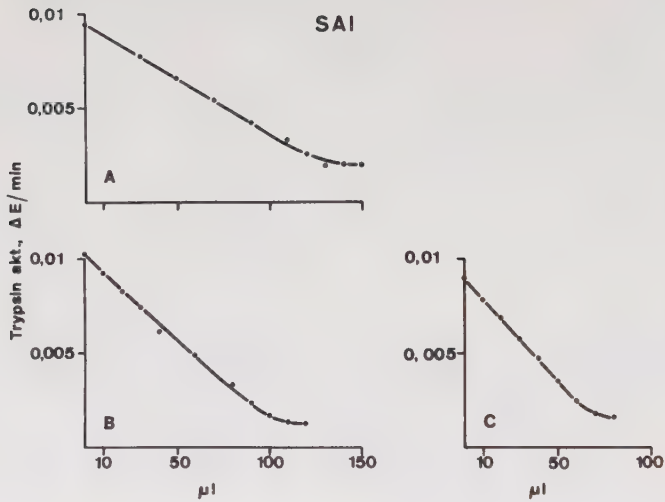


Abb.8 Titration von Trypsin mit 10 - 150 μl
Seeanemonen-Inhibitor (100 $\mu g/ml$)
A = Novo Trypsin, B = α -, C = β -Trypsin

3. Diskussion

Die in der Literatur (36) beschriebene Methode und ihre Modifikation durch uns (Abschnitt 2.2.3.4) reicht nicht aus, um α - und β -Trypsin quantitativ voneinander zu trennen. Offensichtlich kommt es während der säulenchromatographischen Auftrennung immer zu einer, wenn auch geringen, enzymatischen Autolyse.

Bei der Darstellung der Trennungsergebnisse durch die SDS-Elektrophorese ist bei der Reduktion der Disulfidbrücken der Trypsinkomponenten der Zusatz von PMSF wichtig, da sonst während dieser Prozedur autolytische Prozesse ablaufen und somit die Ergebnisse verfälscht werden.

Die Konzentrationsbestimmung durch Absorptionsmessung bei 280 nm ist nur für reines Trypsin anwendbar. Da in den für die Messung eingesetzten Trypsinlösungen sehr wahrscheinlich noch inertes Protein enthalten war, liegt die Fehlerbreite der Aussage relativ hoch.

Die aus den Verhältnissen der Spaltungsgeschwindigkeit zweier Substrate (BAEE/L-BAPA) für α - und β -Trypsin gewonnenen Unterschiede sind mit 1 : 1,2 zu gering, um daraus das Vorliegen einheitlicher Enzymformen ableiten zu können.

HUSI-I hemmt als relativ schwacher Trypsininhibitor α - und β -Trypsin im Rahmen der methodischen Fehlerbreite gleich stark. Daraus folgt, daß K_1 -Werte, die bislang mit käuflichem Trypsin - also einem Gemisch aus α - und β -Trypsin - bestimmt worden sind, nicht korrigiert werden müssen.

Die angeführten Ergebnisse der Trypsininhemmung durch Seeanemonen-Inhibitor zeigen eindeutige Unterschiede in den Komplexen mit α - und β -Trypsin, die sich wie 1 : 1,55 zueinander verhalten. Unerklärlich ist aber, daß der K_1 -Wert des Novo Trypsins, des Trypsingemisches also, mit 1 : 3,5 soviel höher liegt. Möglicherweise reagieren andere Trypsinformen auch mit Seeanemonen-Inhibitor, so daß eine kompetitive Verdrängung vorliegt. Dies würde auch erklären, daß α -Trypsin stärker gehemmt wird als β -Trypsin.

Literaturverzeichnis

- 1 I. H. Northron, M. Kunitz, R. Herriot, "Crystalline Enzymes", 2. Auflage, Columbia Univ. Press, New York, 1948;
- 2 F. Tietze, JBC 204, 1 (1953);
- 3 L. W. Cunningham, Jr., F. Tietze, N. M. Green, H. Neurath, Discussions Faraday Soc. 13, 58 (1953);
- 4 A. K. Balls, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 53, 392 (1965);
- 5 D. D. Schroeder, E. Shaw, JBC 243, 2943 (1968);
- 6 M. R. McDonald, M. Kunitz, J. Gen. Physiol. 25, 53 (1941);
- 7 M. Kunitz, J. Gen. Physiol. 22, 429 (1939);
- 8 J. Yamashina, BBA 20, 433 (1956);
- 9 A. Engel, R. Alexander, L. Pechet, Biochemistry 5, 1543 (1966);
- 10 C. Gabeloteau, P. Desnuelle BBA 42, 230 (1960);
- 11 K. Nakaniski, J. Biochem. (Tokyo) 46, 1263 (1959);
- 12 T. Hofmann, R. Shaw, BBA 92, 543 (1964);
- 13 M. Kunitz, J. Gen. Physiol. 21, 601 (1938);
- 14 E. W. Davie, H. Neurath, JBC 212, 515 (1955);

- 15 V. Holeyšovský, V. Tomášek, O. Milés, A. S. Danilova, F. Šorm, Coll. Czech. Chem. Commun. 30, 3936 (1965);
- 16 D. L. Kauffman, JMB 12, 929 (1965);
- 17 S. Maroux, M. Rovey, P. Desnuelle, BBA 140, 377 (1967);
- 18 R. L. Smith, E. Shaw, JBC 244, 4704 (1969);
- 19 O. Mikeš, V. Holeyšovský, V. Tomášek, F. Šorm, BBRC 24, 346 (1966);
- 20 O. Mikeš, V. Tomášek, V. Holeyšovský, F. Šorm, BBA 117, 281 (1966);
- 21 K. A. Walsh, D. L. Kauffman, K. S. V. Sampath Kumar, H. Neurath, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 51, 301 (1964);
- 22 K. A. Walsh, H. Neurath, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 52, 884 (1964);
- 23 Northrop, I. H., M. Kunitz, J. Gen. Physiol. 16, 295 (1932);
- 24 M. Bier, F. F. Nord, Arch. Biochem. Biophys. 33, 320 (1951);
- 25 J. Travis, J. E. Liener, JBC 240, 1962 (1965);
- 26 Worthington Manual, "Enzymes and Enzyme Reagents" (EC 3.4.4.4) 1967;
- 27 B. Jirgensons, JBC 241, 147 (1966);
- 28 B. Jirgensons, ABB 74, 57 (1958);
- 29 B. Keil, F. Šorm, FEBS Symp. No. 1, p 37 (1964);

- 30 M. L. Bender, F. J. Kézdy, J. Acad. Sci. 86, 3704 (1964);
- 31 M. L. Bender, J. V. Killhoffer, Jr., J. Acad. Sci. 86, 5330 (1964);
- 32 Trautschold, I., Habilitationsschrift, Universität München, (1965);
- 33 Liener, I. E., Arch. Biochem. Biophys. 88, 216 (1960);
- 34 Cole, R. D., Kinkade, J. M., Jr., J. Biol. Chem. 236, 2443 (1961);
- 35 Maroux, S., Ravery, M., Desnuelle, P., Biochim. Biophys. Acta 56, 202 (1962);
- 36 Luthy, J. A., Praissmann, M., Finkenstadt, W. R., Laskowski, M., Jr., J. Biochem. 248, 1760 (1973);
- 37 C. Gabeloteau, Desnuelle, P., ABB 69, 475 (1957);
- 38 M. Delaage, Lazdunski, M., BBRC 28, 390 (1967);
- 39 J. P. Abita, Delage, M., Lazdunski, M., Savrda, J. European J. Biochem. 8, 314 (1969);
- 40 K. Weber, Pringle, J. R., Osborn, M. in: Methods in Enzymology Band XXVI, Part C;
- 41 H. Haendle, Fritz, H., Trautschold, I., Werle, E., Z. physiol. Chem. 343, 185 (1965);
- 42 M. Waldschmidt, Hoffmann, B., Karg, H., Zuchthygiene 1, 15 (1966);
- 43 H. Ingrisch, Haendle, H., Werle, E., Andrologie 2, 103 (1970);

- 44 H. Fritz, Fink, E., Gebhardt, M., Hochstraßer, K., Werle, E.,
Z. physiol. Chem. 350, 933 (1969);
- 45 H. Fritz, Förg-Brey, B., Fink, E., Schiessler, H., Jaumann,
E., Arnhold, M., Z. physiol. Chem. 353, 1007 (1972);
- 46 H. Fritz, Trautschold, I., Werle, E., in: Methoden der enzyma-
tischen Analyse (Bergmeyer, H. U., ed) Verlag Chemie 1970 2.
Ed., pp. 1221;
- 47 K. Hochstraßer, Reichert, R., Matzner, M., Werle, E., Z. klin.
Chem. klin. Biochem. 10, 1 (1972);
- 48 O. Wallner, Fritz, H., Z. physiol. Chem., in press;
- 49 H. Schiessler, Arnhold, M., Fritz, H., Z. physiol. Chem., in
press;
- 50 M. Percy, Buchwald, B., Analyt. Biochem. 45, 60 (1972);
- 51 H. Schiessler, Arnhold, M., Fritz, H., Vortrag;
- 52 V. Kostka, Carpenter, F. H., J. Biol. Chem. 239, 1799 (1964);
- 53 F. H. Carpenter, in: The Enzymes, Chapter 26 , S. 237;
- 54 N. M. Green, Work, E., Biochem. J. 54, 347
- 55 L. Béress, Béress, R., Kieler Meeresforschung 27, 117 (1971);
- 56 L. Béress, Kortmann, H., Fritz, H., Z. physiol. Chem. 353,
111 (1972);
- 57 H. Fritz, Brey, B., Béress, L., Z. physiol. Chem. 353, 19
(1972);

- 58 H. Kortmann, Fritz, H. Béress, L., Z. physiol. Chem. 353, 111 (1972);
- 59 G. Wunderer, Kummer, K., Fritz, H., Béress, L., Machleidt, W. (1974) in: Bayer Symp. V Proteinase Inhibitors (Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L. J., and Truscheid, E., eds), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, in press;
- 60 W. Machleidt, Kerner, W., Otto, I., Z. Anal. Chem. 252, 151 (1970);
- 61 H. Fritz, Oppitz, K.-H., Meckl, D., Kemkes, B., Haendle, H., Schult, H., Werle, E., Z. physiol. Chem. 350, 1541 (1969);
- 62 K. Engler, in Vorbereitung;
- 63 G. Wunderer, in Vorbereitung;
- 64 R. M. Stroud, Kay, L., M., Dickerson, R., E., J. Mol. Biol. 83, 185 (1974);

Teil II

Elektrophoretische Charakterisierung verschiedener Fraktionen
eines Trypsin-Plasmin-Inhibitors aus den Speicheldrüsen des *Hirudo medicinalis* und Isolierung der Fraktion mit der höchsten
spezifischen Aktivität

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Bd	Bdellin
BAPA	N ^α -Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
EMA	Äthylenmaleinsäureanhydrid
IU	Inhibitor Unit
mIU	Inhibitor Milliunit
MG	Molekulargewicht
TPI	Trypsin-Plasmin-Inhibitor
TRA	Triäthanolamin
TsI	Thrombin-spezifischer Inhibitor

Inhaltsverzeichnis

- 1 Theoretischer Teil
 - 1.1 Vorkommen
 - 1.2 Isolierung und chemische Charakterisierung

- 2 Eigene Untersuchungen
 - 2.1 Meßmethoden
 - 2.1.1 Trypsinaktivität
 - 2.1.2 Inhibitoraktivität
 - 2.2 Elektrophoresen und Hemmkurven
 - 2.3 Gleichgewichtschromatographie
 - 2.4 Rechromatographie

- 3 Diskussion

1 Theoretischer Teil

1.1 Vorkommen

Die Bdeline genannten Trypsin-Plasmin-Inhibitoren (TPI) sind in allen Teilen des Blutegels *Hirudo medicinalis* zu finden, vor allem aber in den Speicheldrüsen (1,2) und - in höchster Konzentration - in den äußeren Geschlechtsorganen (5, s. ref. 13). Fritz et al. (3) gewannen TPI aus im Handel erhältlichen Hirudinpräparaten, bei welchen sie eine Hemmung von Trypsin, Plasmin und Thrombin feststellten. Da das von Markwardt et al. (1) und de la Llasa et al. (2) aus Blutegeln isolierte Hirudinpräparat nur Thrombin-spezifischen Inhibitor (TsI) enthielt, dessen Herstellung beschrieben ist (4), wurde auf einen in den Handelspräparaten noch enthaltenen TPI geschlossen.

1.2 Isolierung und chemische Charakterisierung

Die von Fritz et al. (5) ausgearbeitete Isolierung der Bdeline läuft in vier Schritten ab:

1) Trennung von TPI und TsI an DEAE-Cellulose-Säulen mit Natriumacetat als Puffer. TsI wird unter diesen Bedingungen an der Säule festgehalten, während TPI eluiert wird. Später kann mit einem anderen Puffer TsI ebenfalls eluiert werden.

2) Um TPI von Verunreinigungen zu befreien, wird er an EMA-Trypsin- (6) oder Trypsin-Cellulose-Harz spezifisch gebunden

und von allen Contaminationen befreit. Anschließend wird der Komplex wieder dissoziiert.

3) Der reine Inhibitor wird nun über eine DEAE-Cellulose-Säule mit Hilfe zweier Puffer unterschiedlicher Ionenstärke in zwei Fraktionen eluiert, deren erste, Bdelin-A, ca. 55% der aufgetragenen Hemmkapazität ausmacht und eine geringere spezifische Aktivität aufweist als die zweite Fraktion, Bdelin-B.

4) Beide Fraktionen werden nun noch durch Gleichgewichtschromatographie in fünf (Bd.A) bzw. sechs (Bd.B) Komponenten aufgetrennt, von denen Bdelin-B₃ die höchste spezifische Aktivität aufweist.

Mit den Gemischen der Bdeline A und B wurde an Sephadex G-75-Säulen das Molekulargewicht experimentell zu 7000 für Bdelin-A und zu 5600 für Bdelin-B bestimmt. Diese Werte stehen in guter Übereinstimmung zu den aus der Aminosäurezusammensetzung errechneten Werten. Bdelin-B ist somit der kleinste bisher bekannte, natürlich vorkommende Inhibitor für Trypsin und Plasmin.

In ihrer Aminosäurezusammensetzung unterscheiden sich Bdelin-A und B signifikant, so daß eine genetische Beziehung unwahrscheinlich ist (5). Für die Aminosäure-Unterschiede innerhalb der beiden Gruppen A und B sind zwei Erklärungen denkbar: Einmal ein enzymatischer Abbau während der Lagerung der abgetöteten Tiere und während der ersten Isolierungsschritte (5). Zum anderen ist auch die Synthese der verschiedenen Komponenten durch mutierte Gene möglich (7). Wie bei den meisten bisher bekannt gewordenen

Proteinaseinhibitoren findet sich auch bei Bdellin-A und B eine relativ große Zahl an Disulfidbrücken (8). Beachtenswert ist auch ein hoher Betrag an Histidin-Resten in beiden Fraktionen. Bdellin-B₃ enthält folgende Aminosäuren nicht: Prolin, Methionin, Isoleucin, Phenylalanin, Tryptophan (5). Damit ist dies der erste bekannte Proteinase-Inhibitor ohne Prolin-Rest (9). Der einzige Lysin-Rest sitzt im reaktiven Zentrum, sodaß der Einfluß einer chemischen Veränderung dieses Restes auf die Trypsin- und Plasminhemmung genau verfolgt werden kann (10). Durch Maleoylierung gehen mehr als 96% der Hemmwirkung gegen diese beiden Proteinase verloren. Die Sequenz von Bdellin-B₃ wird zur Zeit erforscht.

Bdellin-A und B sind starke Inhibitoren von Rindertrypsin und Schweineplasmin (11), da je ein Enzymmolekül mit je einem Inhibitormolekül einen Komplex bildet. Folgende Proteinase werden durch keine der beiden Bdellinfraktionen gehemmt: Schweinepankreas-Kallikrein, Rinder- α -Chymotrypsin, Subtilisin Novo (5).

2 Eigene Untersuchungen

2.1 Meßmethoden

2.1.1 Messung der Trypsinaktivität, siehe Teil I 2.1.1.1

Abweichend von der Vorschrift in Abschnitt 2.1.1.1 wurde 0,2 M TRA-Puffer, pH 7,8 und als Substrat DL-BAPA (100 mg/100 ml aqua dest.) verwandt.

2.1.2 Messung der Inhibitoraktivität, siehe Teil I 2.1.2

Abweichend von der Vorschrift in Abschnitt 2.1.2 wurde als Substrat nicht BAEE sondern DL-BAPA eingesetzt entsprechend der in Abschnitt 2.1.1.1, Teil I gegebenen Bedingungen.

Reagentien:

1. Trypsinlösung: 1 mg Trypsin (Novo) in 10 ml 0,0025 N HCl;
2. Puffer: 0,2 M TRA/HCl, pH 7,8;
3. Substrat: DL-BAPA (100 mg/100 ml aqua dest.) im Wasserbad bei 80°C gelöst;
4. Inhibitor: Bdeilin-B-Komponenten aus Eluatproben oder Lösungen früher isolierter Bdeilin-Mischungen, die 1 mg Inhibitor/100 ml enthielten.

Küvettenansätze:

Bezugswert: 0,1 ml Trypsinlösung + 1,9 ml TRA-Puffer;

Hemmansatz: 0,02 - 0,4 ml Inhibitorlösung, auf 2,0 ml mit TRA-Puffer auffüllen;

Nach 5 min Inkubation Zugabe von je 1,0 ml DL-BAPA-Lösung, mischen. Bei 25°C wird die Extinktionsänderung pro Minute über 5 min bei 405 nm gemessen.

Berechnung: entsprechend Abschnitt 2.1.1.1, Teil I bzw. Abschnitt 2.1.1, Teil I nach den Formeln

$$\frac{\Delta E_M}{0,00332} = \text{mU} \quad \text{bzw.} \quad \frac{\Delta E_{MB} - \Delta E_{MI}}{0,00332} = \text{mIU}$$

2.2 Elektrophoresen und Hemmkurven

Ein erster Versuch mit "Reinhirudin Lot 16 799 Dolder + Co Basel", bei dem die Probe auf Acetatfolie aufgetragen wurde und als Puffer 0,05 M Natriumborat, pH 8,0 eingesetzt wurde, führte bei einer Laufzeit von 20 Minuten und einer konstanten Spannung von 200 mV zu einer ungenügenden Auftrennung.

Der Einsatz von 0,015 M Natriumacetat, pH 4,8 als Puffer brachte bei einer 30minütigen Laufzeit und einer konstanten Spannung von 300 mV befriedigende Ergebnisse.

Schwierigkeiten beim Färben und Entfärben mit Coomassie Brilliant Blue konnten nach Austausch des Färbemittels gegen Amidoschwarz behoben werden, da letzteres auch nach dem notwendigen, langen Entfärben mit Methanol und Eisessig noch genügend stark gefärbte Banden zeigte. Nach dieser Methode wurden nun Proben von

allen aus den von Fritz et al. (5) beschriebenen Arbeiten vorhandenen Präparaten aufgetrennt. Auf Grund der Herkunft dieser teils mehr, teils weniger gereinigten Bdeiline und dem Vergleich ihrer Auftrennung untereinander, konnten die einzelnen Banden identifiziert und den verschiedenen Bdeillin-Komponenten zugeordnet werden (siehe Tabelle I). Die angegebenen Prozentwerte wurden teils mit dem Densitometer bestimmt, teils geschätzt. Sind in einer Reihe zwei Werte angegeben, so handelt es sich um zwei Banden, die jedoch noch innerhalb des entsprechenden Bereiches liegen. So wird es sich zum Beispiel bei den beiden Banden von Bdeillin-A+B (Gemisch) in der Reihe Bd.B_{1,2} einmal um das weiter anodisch gelegene Bdeillin-B₁ (10%), zum anderen um Bdeillin-B₂ (30%) handeln. Bei den Präparaten, bei denen die Summe der Komponenten nicht 100% ergibt, liegen die fehlenden Beträge in einer oder mehreren ganz schwachen, unbedeutenden Banden, die daher nicht angegeben wurden.

Das elektrophoretische Verhalten der Komponenten war wie folgt: Bdeillin-B_{1,2} wandert als einziges anodisch. B₃ entfernte sich nur ganz gering in Richtung Kathode vom Auftragsort. Bdeillin-B_{4,5,6} wandert in gleicher Richtung wesentlich weiter, während Bdeillin-A die größte positive Ladung besitzt.

Das Wanderungsverhalten des Präparates Bdeillin-B₃, der bisher reinsten und mit der höchsten spezifischen Aktivität ausgestatteten Bdeillin-Komponente, das zwei etwa gleich starke,

Tabelle I Aufstellung der in den bearbeiteten Präparaten gefundenen Bdellin-Komponenten und ihrer Hemmaktivität

Präparat	Bd.B _{1,2} %	Bd.B ₃ %	Bd.B _{4,5,6} %	Bd.A %	Hemmaktivität mIU/
Bd.A+B (Gemisch) X	10/30	60			3,45
TPI-B nach UF ^X	5	50	30/15		3,0
Bd.B	100				3,214
TPI-B _{1,2}	30/70				3,320
TPI-B _{4,5}		5	30/20	25/15	2,11
TPI-B _{4,5,6}			25/15	40/20	1,722
TPI (Gemisch) X	2/8	35	10/10	35	4,1825
TPI-A aus 1. Aufarbeitung			50	10/40	3,47
Bd.A 29.5.71			20	80	3,81
TPI-A(+B)		10	15/25	35/15	2,495
TPI-A nach G25		10	10/10	40	4,31
TPI-A ältere Aufarbeitung			10	90	2,985
TPI-A				100	2,94
Peak A				50/50	2,83
TPI-B Zwischen- fraktion B _{3a} ^X	10/40	40			2,67
B ₃	5	50/45			5,1

schwach kathodisch gelegene Banden aufweist, bestätigt die von Fritz et al. in l.c. 5 geäußerte Annahme, daß Bdelin-B₃ aus zwei Komponenten besteht.

Um die spezifische Aktivität der einzelnen Präparate zu bestimmen, wurden nach der in Absatz 2.1.2 beschriebenen Methode Hemmkurven angelegt. Die Ergebnisse sind aus Tabelle I, letzte Spalte, zu ersehen.

2.3 Gleichgewichtschromatographie (in Anlehnung an (5))

Die in Tabelle I mit X gekennzeichneten Präparate enthielten die höchsten Beträge an Bdelin-B₃. Sie wurden zusammengegeben und für die Gleichgewichtschromatographie eingesetzt.

DEAE-Cellulose wurde für ca. 1 Stunde in aqua dest. gegeben, um sie quellen zu lassen. Um die OH⁻-Form herzustellen, wurde sie mehrmals mit 0,2 N HCl gewaschen und anschließend mit NaOH versetzt, bis die Silbernitratprobe kein Cl⁻ mehr anzeigte.

Die Cellulose wurde mehrmals mit dem Elutionspuffer, 0,1 M Natriumacetat, pH 5,5, gewaschen, bis das pH der Suspension konstant (5,5) blieb; mit der so behandelten Cellulose wurde eine 1,0 x 55 cm große Säule geschüttet. Die Durchflußgeschwindigkeit wurde auf 4 ml/h eingestellt. Die Säule wurde 12 Stunden mit dem Elutionspuffer equilibriert, bis pH und Leitfähigkeit des Puffers im Reservoir mit pH und Leitfähigkeit im Eluat über-

einstimmten. Nun wurden je 20 mg der Inhibitorpräparate in 2 ml Puffer gelöst und auf die Säule aufgetragen. Es wurde mehrmals mit 1 - 2 ml Puffer nachgewaschen und zuletzt ein 2 ml hoher Pufferspiegel über das Gel geschichtet, der mit Hilfe einer Pumpe auf konstantem Niveau gehalten wurde.

Wir erhielten folgendes Elutionsdiagramm:

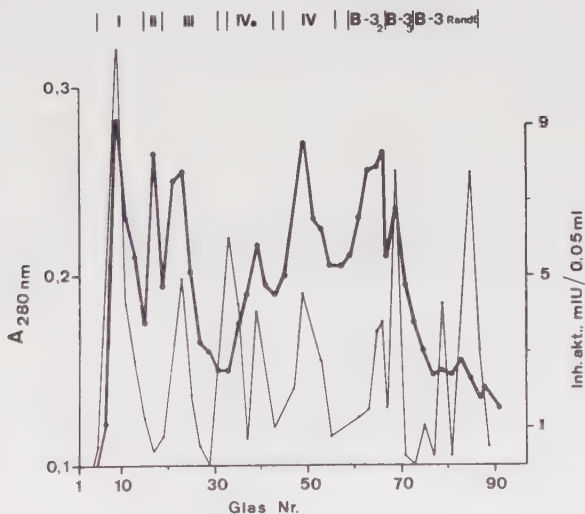


Abb.1 Gleichgewichtschromatographie eines Gemisches von Bdeilin-A und B

- : Absorption bei 280 nm und 25°C, gemessen am Zeiss PMQ III;
- • — : Inhibitoraktivität in mIU nach Abschnitt 2.1.2, Teil II gemessen;

Auf Grund des Verhältnisses zwischen der Absorption bei 280 nm, die der Gesamteinkonzentration entspricht, und der Inhibitoraktivität der gleichen Probe läßt sich die Reinheit einer Fraktion beurteilen. So weist z. B. in Abb.1 die dem Peak B-3₂ entsprechende Fraktion eine im Vergleich zur Proteinkonzentration hohe Aktivität auf; sie ist also weitgehend frei von inaktivem Protein. Der Inhibitorgehalt der einzelnen Fraktionen ist in Tabelle II angegeben. Zuerst erschienen die Bdeilin-A-Komponenten (Peak I-III), dann B_{1,2} (Peak IV) und zuletzt B₃ mit Randfraktionen (5).

Tabelle II Inhibitorgehalt und Benennung der Peaks in der Reihenfolge ihrer Elution

Peak I		1320 mIU
Peak II	} = Bd.A-Komponenten	1400 mIU
Peak III		8300 mIU
Peak IV = Bdeilin _{1,2}		3350 mIU
Peak B ₃₂		3230 mIU
Peak B ₃₃		3000 mIU
Peak B ₃ Randfraktion		6000 mIU
Peak nach NaCl-Zugabe = B _{4,5,6}		9500 mIU

Um den noch auf der Säule verbliebenen Inhibitor abzulösen, mußte die Salzkonzentration des Puffers durch Zusatz von 0,4 M NaCl erhöht werden (5). Es wurde ein weiterer Peak eluiert, in Tabelle II mit "Peak nach NaCl-Zugabe" bezeichnet, der den Bdelin-B-Komponenten 4,5,6 entspricht (5).

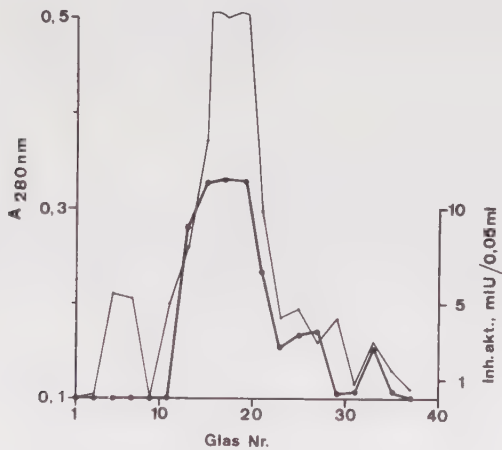


Abb.2 Elutionsdiagramm nach
Zusatz von 0,4 M NaCl

— • — : Inhibitoraktivität in mIU
— — : Absorption bei 280 nm

Die Inhalte der Gläser der einzelnen Fraktionen wurden zusammengegeben und die Aktivität der Gesamtfaktionen nach Abschnitt 2.1.2, Teil II, gemessen (s. Tabelle II). Anschließend wurde in Amicon-Ultrafiltrationskammern (Membran UM-05) konzentriert und dann tiefgefroren.

Ein weiterer Chromatographielauf mit der restlichen Substanz ergab unter gleichen Bedingungen, nur mit erhöhter Durchflußgeschwindigkeit (6 ml/h) ebenfalls sechs Peaks, von denen B_{32} 5327 mIU und B_{33} 2580 mIU an Aktivität enthielt.

2.4 Rechromatographie

Die B_{33} -Fraktionen der beiden Auftrennungen wurden zusammengegeben und durch Ultrafiltration auf 2 ml (4520 mIU) eingeeengt. Sie wurden dann auf eine DEAE-Cellulose(OH^-)-Säule (40,5 x 1cm) aufgetragen, die - wie in Abschnitt 2.3 beschrieben - mit 0,1 M Natriumacetat, pH 5,5 #quillibriert und entwickelt worden war. Die Durchflußgeschwindigkeit lag bei 6 ml/h.

Mit dem gleichen Puffer wurden 1550 mIU zurückgewonnen. Weitere 2000 mIU erhielt man, nachdem wie in 2.3 die Ionenkonzentration des Puffers auf 0,4 M NaCl erhöht worden war.

Die Rechromatographie der B_{32} -Fraktion des ersten Laufes wurde unter identischen Bedingungen ausgeführt. Die wiedergewonnenen 1200 mIU waren jedoch ausschließlich nach NaCl-Zusatz im Eluat.

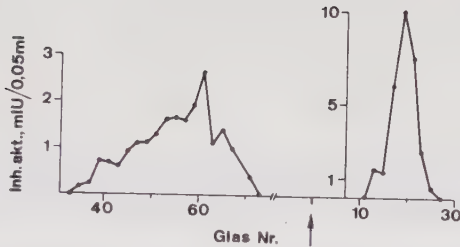


Abb.3 Rechromatographie
von Bdeilin-B₃₃
= NaCl-Zugabe

Die B₃₂-Fraktion der zweiten Auftrennung wurde unter denselben Bedingungen wie die vorherigen rechromatographiert. Hier wurde der gesamte Inhibitor in einer einheitlichen Fraktion bereits vor NaCl-Zusatz ausgewaschen; ihre Aktivität betrug 4500 mIU.

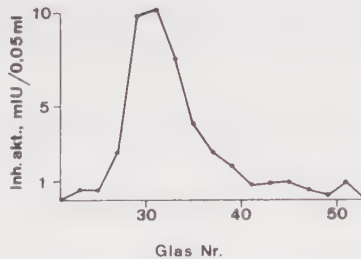


Abb.4 Rechromatographie von Bdeilin-B₃₂,
2. Aufarbeitung
Details s. Text

3. Diskussion

Die angegebene chromatographische Methode eignet sich zur gleichzeitigen Auftrennung aller Bdeilinfraktionen. Für die Analytik der Bdeiline ist dieses Verfahren wichtig, da es eine quantitative Trennung der einzelnen Fraktionen ermöglicht. Die beschriebene elektrophoretische Auftrennung der Bdeilinfraktionen erlaubt eine rasche und problemlose Identifizierung der Trypsin-Plasmin-Inhibitorfraktionen an Hand der Wanderungsgeschwindigkeiten der einzelnen Banden unter standardisierten Bedingungen. Hiermit steht ein Verfahren bereit, mit dessen Hilfe die Reinheit der durch Ionenaustauschchromatographie gewonnenen Fraktionen auf rationelle Weise testbar ist.

Literaturverzeichnis

- 1 Markwardt, F., in: Methods in Enzymology 19, 924 (1970);
- 2 De la Llasa, P., C. Tertrin, M. Justisz, Biochim. Biophys. Acta 93, 40 (1964);
- 3 Fritz, H., Oppitz, K.-H., Gebhardt, M., Oppitz, I., Werle, E., Marx, R., Z. physiol. Chem. 350, 91 (1969);
- 4 Markwardt, F., Blutgerinnungshemmende Wirkstoffe aus blut-saugenden Tieren, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1963;
- 5 Fritz, H., Gebhardt, M., Meister, R., Fink, E., Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors, Munich, Nov. 1970, Walter de Gruyter, Berlin - New York;
- 6 Fritz, H., Gebhardt, M., Fink, E., Schramm, W., Werle, E., Z. physiol. Chem. 350, 129 (1969);
- 7 Fritz, H., Jaumann, E., Meister, R., Pasquay, P., Hochstraßer, K., Fink, E., Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors, Munich, Nov. 1970, S. 257
- 8 Laskowski, Jr., M., Sealock, M. und R. W., in: The Enzymes 2 (3. Ausgabe), Paragraph III-C-3;
- 9 siehe ref. (8), Paragraph III-C-5;
- 10 Fritz, H., Fink, E., Gebhardt, M., Hochstraßer, K., Werle, E., Z. physiol. Chem. 350, 933 (1969);
- 11 siehe ref. (5), Fig. 4 und 5;

Herrn Prof. Dr. phil. Dr. med. E. Werle und Herrn Prof. Dr. rer. nat. H. Fritz danke ich für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. H. Fritz sowie seinen Mitarbeitern im Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie bin ich für zahlreiche anregende Diskussionen und vielseitige Hilfe zu Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 22. 9. 1948 wurde ich als Sohn des Werkmeisters Robert Biekarck und seiner Ehefrau Karoline, geb. Sauler, in Augsburg geboren.

Im Juli 1968 erlangte ich am Humanistischen Gymnasium St. Anna zu Augsburg das Zeugnis der Reife. Nach Ableistung des Wehrdienstes bei Sanitätseinheiten des Heeres nahm ich im Sommersemester 1970 das Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilian Universität München auf. Hier legte ich am 17. 2. 1976 die ärztliche Prüfung mit dem Urteil sehr gut ab.

